

海綿の分離細胞の遠心凝着塊の観察

岸 田 嘉 一 ・ 本 多 光 夫 ・ 里 見 肇
中 村 和 雄 ・ 木 戸 哲 二

金沢大学理学部生物学教室

Observation on the Aggregate from the Centrifugal Pellet Made of the Dissociated Sponge Cells

Yoshikazu KISHIDA, Mitsuo HONDA, Hajime SATOMI,
Kazuo NAKAMURA and Tetsuji KIDO

Department of Biology, Faculty of Science, University of Kanazawa

カイメンの分離細胞が容易に再凝集体を形成し、結局、それが機能的な個体にまで構成される現象について、Wilson (1907) の研究以来、多くの研究者の興味を惹いてきた。この現象を理解する方法として、大きく二つに分けられるであろう。一つは分離細胞相互の凝着機構であり、他は再凝着後の凝着体中における細胞の組織構築機構である。前者については脊椎動物の分離培養細胞を用いた多くの研究 (Townes and Holtfreter, 1955 ; Moscona, 1961 a, b, 1962, 1963 ; Steinberg, 1962 ; Kuroda, 1968) とともに、カイメン細胞の種特異的な再凝集の機構が追求されている (Curtis, 1962 ; Humphrey, 1963 ; Spiegel 1954)。一方、後者に関しては、ヒドラやプラナリアなどの再生現象における細胞の分化と関連して、一般に、下等無脊椎動物で生ずる細胞分化の様式という重要な問題に手がかりを与えないであろうか。現在、カイメンに関して、後者の問題について、例えば、Galtsoff (1925) は小さい凝集塊は機能的なカイメンになり得ず、ある大きさ以上でそれが可能であるといっているだけで細胞レベルでの検討は稀である。このような見解での研究にはカイメンの分離細胞を再凝集させる際の外的条件をできるだけ一定にする必要があり、さらにカイメンの細胞が比較的小型で、細胞質内顆粒が多いために、通常のパラフィン切片では組織、細胞の観察が不十分にならざるをえないという2点を克服しなければならない。

以上の観点から、われわれはカイメンの分離細胞の凝集条件の定常化と、細胞観察のより明確さについて多少の知見を得たのでここに報告する。

材 料 及 び 方 法

材料としては、金沢大学能登臨海実験所付近の浅海で採集したホソナガザラカイメン、*Callyspongia elongata* を使用した。

前報 (木戸・岸田, 1965) と同様に、ナイロンゴーズで、Ca, Mg 欠如海水中にカイメン細胞を分離した。分離細胞は数回、Ca, Mg 欠如海水で洗ったのち、500~800 rpm で遠沈して、遠心管の底に集めた。次いで、内径 3 mm のガラス管の一端にゴムキャップをつけてつくった広口スポイトを遠心管中の細胞集積の中へ挿入して引き抜き、スポイトの中の細胞集塊を Ca, Mg 欠如海水を入れたシャーレの中に、ゴムキャップで押し出すと、径 3 mm の円筒状のカイメン細胞塊が得られた。これを巾約 1 mm に切断したも

のを遠心凝集塊として実験に用いた。

上記のようにしてつくった遠心凝集塊を正常海水に移したのち、10分、30分、1、2、3、5、7、9時間たった凝集塊（それぞれ 10 m-Agg, 30 m-Agg, 1 h-Agg 等と略す）を、海水にとかした氷冷 1% OsO₄ で 1 時間固定した。別に、Ca, Mg 欠如海水から直ちに固定液に移したもの（0 h-Agg と略す）、および、分離しないカイメン体の一部を同様の方法で固定して対照とした。アセトン系列で脱水後、Epon 812 に包埋し、JUM-5B 型超ミクロトームで half-thin section (0.5~1 μ) をつくり、toluidine blue で染色 (Yamamoto, 1963) し観察した。

観 察

1. 凝集塊中の細胞の観察

まず、凝着開始前の状態である 0 h-Agg を構成する細胞について観察した。

a) Nucleolate cell (Fig. 1-A, B) : 凝集塊中で最も顕著に見られる細胞で、直径 13~15 μ の、比較的大きな細胞である。この細胞の核は明るくみえ (toluidine blue ではほとんど染まらない)、直径は 3~5 μ である。核の中に 1~1.5 μ の大きく明瞭な核小体が見られる。細胞質中には toluidine blue で濃く染まる大小種々の顆粒が含まれている。この顆粒は、ときには 3~5 μ に達することもあるが、通常は 1~2 μ 以下である。

凝集塊中にはこの細胞の核と全く同様の核をもちながら、それより小型の細胞が多数見られる。これらは、おそらく同種の細胞の一部切断片と考えてよいであろう (Fig. 1-A)。もしそうであるとすれば、凝集塊中におけるこの種の細胞の数はきわめて多いといえよう。

b) Choanocyte (Fig. 1-C) : この細胞は小型であるが、鞭毛と襟をもっているのが容易に同定できる。凝集塊中ではかなり数が多い。

細胞体の部分は直径約 4 μ で、長さ約 15 μ の鞭毛を 1 個もっている。核は toluidine blue で均一に染まり直径約 1.5 μ である。ほとんど例外なく、核の付近に、核と略々同大の 2 個の顆粒を含んでいる。この細胞の襟の位置で切断した切片では、点として表われる 1 個の鞭毛をとりまいて、輪状に配列した襟部をみとめることができる (Fig. 1-C)。

c) Gray cell (Fig. 1-D) : 細胞質中に約 1 μ の大きさの顆粒を数多く含んだ直径約 15 μ の大型の細胞である。この顆粒は toluidine blue で濃く染まり、前出した nucleolate cell の顆粒とよく似ているが、大きさが略々一定しており、染まり方も、より均一である。この細胞の核は切片では稀にしか表れなかったが、比較的小さく、核小体をもたず、toluidine blue にもあまり染まらない。

d) Rhabdiferous cell (Fig. 1-A) : 凝集塊の中で極めて稀に、桿状含有物を含む細胞が見られた。この含有物は toluidine blue で染まり、観察された最大のもので長さ 10 μ、巾 3 μ であった。これまでの観察で、この細胞の核を通る切片がみられなかったので細胞の大きさを断定することはできない。しかし、その含有物から考えて、Wilson and Penney (1930) によって記載された rhabdiferous cell と考えてよいであろう。

2. 遠心集着塊の経時的変化

“0 h-Agg” では、細胞間隙は極めてまちまちであり、ある細胞では隣接する細胞と接着しているが、あるものでは全く遊離しており、とくに表面に近い層では 100~200 μ に達する亀裂ともいえる間隙がある (Fig. 2-A)。細胞は大部分球形である。構成細胞は nucleolate cells と Choanocytes が圧倒的に多く、gray cell も屢々見られるが、rhabdiferous cell は稀であり、典型的な表皮細胞はこれまで観察することができなかった。凝集塊の内部は、遠沈による圧力のため異常に緻密な所もみられた。

“30 m-Agg” や “1 h-Agg” (Fig. 2-B) では細胞間隙はいまだ、かなり広く、細胞も球形のものが多く、“0 h-Agg” の表面で見られるような亀裂状の間隙も、遠沈による異常な緻密さもみられなくなっている。

“3 h-Agg” (Fig. 2-C) は、凝集塊中の細胞の集合は、全体に著しく緻密となり、個々の細胞を判別することが困難なほど細胞間隙が短縮されている。

この時期の凝集塊で、はじめてその周縁部に、非常に細長く伸びた細胞が見られた。(Fig. 2-D)。この細胞の核は楕円形で toluidine blue でうすく、均一に染まり、核小体は存在しない。細胞質中には toluidine blue で濃く染まる顆粒が少数見られた。この細胞はカイメンの典型的な表皮細胞、いわゆる pinacocyte で、分離しないカイメン体で見られる表皮細胞と全く同じであった。この stage は凝集塊に著しい変化が見られる時期と考えてよいであろう。

“5 h-Agg” では、凝集塊の内部は “3 h-Agg” よりも却って、やゝ粗になり、細胞間隔が離れてきているようであるが、表層に近い層では細胞凝着は緻密である (Fig. 2-E)。この傾向は “7 h-Agg” (Fig. 2-F) や “9 h-Agg” でも同様であって、時間の経過に伴って著しくなり、“9 h-Agg” のあるものでは、凝集塊内部で細胞崩壊がすすんでいる例も見られた。

観察したすべての凝集塊に、choanocytes でかこまれた鞭毛室が見られた。この鞭毛室は “0 h-Agg” から “3 h-Agg” までの間に次第に数が増加する傾向があるようである。しかし、個々の鞭毛室は却って小さくなる。“5 h-Agg” 以後では凝集塊の表層近くの細胞層中には鞭毛室が見られるが、内部では殆んど見られなかった。

論 議

カイメンの細胞は分離が容易であり、かつ、その分離細胞は海水中に放置するだけで再凝集して、機能的な個体を形成するから、細胞の再凝着に関連した現象を研究するには甚だ都合のよい材料である。しかし、再凝集体の状態は再凝集開始時における細胞の密度によって異なることはすでに報告した (木戸・岸田・朝倉・山田, 1965)。そこで、再凝集体を研究するには、常に復元可能な状態におかれるように注意しなければならない。Moscona (1961) は、このような目的のために rotation-mediated procedure を考案し、この方法は、その後、細胞凝集の研究者によって広く用いられてきた (Humphrey, 1963, Kuroda 1963)。この方法は、事実、この目的のために有効ではあるが、何時、何処でも使用可能というわけにはいかない。そこで、われわれは、それより簡単に凝集条件も一定にする目的で、Ca, Mg 欠如海水中での遠心塊から再凝集を開始させる方法をこころみた。この方法を用いると、細胞懸濁中の細胞数に関係なく、一定の遠心力によって常に略々安定した凝着塊を得ることができた。しかし、一方、spicule などの不純物が凝集塊中に混入する欠点があるため、適当な遠心力を用いて不純物の混入をできる限り除去するように注意しなければならない。

このようにしてつくられた遠心凝集塊に含まれる細胞は、最初は機械的に集められるだけであるが、正常海水に入れられると、生物学的な意味での凝集を始め、3時間で、細胞凝集塊は最も compact になる。このことは、凝集塊の中で、この時間内に、細胞と細胞との間隔を縮めるような力が働いたことは確かである。これは、特定の細胞、例えば amoebocyte の pseudopode によるものか (木戸・鬼武, 1966)、それとも塊内のすべての細胞の協調による何らかの作用によるものかは明らかでない。この “3 h-Agg” の凝集塊表面には、細長く伸びた典型的な pinacocytes が見られた。この種の細胞は、これより以前の凝集塊には認められなかったのであるから、この時期に他の type の細胞から分化してきたか、または、凝集塊中に、細胞分離によって、すでに変形した pinacocyte が sorting-out によって表層へ移動してきたものであろうが、凝集塊内部では typical な pinacocyte は勿論、変形した pinacocyte と思われる細胞も、今回の観察では、認めることはできなかったことから、他の type の細胞から分化した可能性が強い。“3 h-Agg” の表面はすべて pinacocyte によっておおわれているわけではなく、一部には nucleolate cell も多く見られるので、このような細胞からの転化が考えられるかもしれない。nucleolate cell は、多くの研究者が totipotent と考えている archeocyte と、形態的に全く同じであるが、Mookerjee and Ganguly (1964) はカイメン体中の archeocyte の数は60%とっている。今回の観察でも、遠心凝集塊中には nucleolate cell が非常に多く含まれていた。この nucleolate cell の本質的機能が未分化で貯蔵されただけのものであるかどうか

は今後の問題である。

5時間以後の凝集塊では、内部の細胞接着が loose になり、遂には細胞崩壊がおこるが、表層付近の細胞は健康で、細胞間の接着は compact になっていく。この過程が、凝集塊内部の酸素不足のためにおこるのか、それとも、内部の空洞化と表層部の緻密性が、機能的カイメンをつくるための形態形成の一過程であるのかについては、凝集塊の長期間飼育によって確かめられなければならない。

著者らは、プラナリアの咽頭（木戸・岸田・朝倉，1964）やウニ胚（木戸・岸田1967）で、Epon 包埋の half-thin section を用いることにより、細胞レベルでの光顕観察がパラフィン切片よりはるかに容易になることを見出した。今回の観察から、カイメンの細胞についても同様のことがいえる。とくに、choanocyte のような小形の細胞では、この方法は極めて有効であって、細胞内の顆粒や、襟や鞭毛についての観察は、電顕的観察と比較しうる程度に明瞭であった。ただこの方法は、あまり大きな試料を切片にすることができず、凝集塊の一部しか観察できないという欠点があるので、パラフィン切片による概観的観察は併用されなければならないだろう。

最近、Epon 包埋の half-thin section の polychromatic staining の方法が開発されているので、今後、カイメンの細胞を、この方向で研究することは、細胞化学的方法及び電顕観察とともに、カイメンの再凝集の機構を明らかにする手段として使用しうるものと思われる。

要 約

カイメン分離細胞の再凝集後の組織構築機構を研究するために、凝集条件の定常化と、細胞判別の明確さを得る方法として、遠心凝集法と、電顕試料（オスミック酸固定、エポン包埋）の $0.5 \sim 1 \mu$ 切片の光顕的観察を試みた。Ca-Mg 欠如海水中で分離し、同液中で遠心して細胞塊を作り、この状態から細胞凝集を開始させるため、正常海水に移すと、常に略々同一の経過で凝着が行われ、3時間後に、凝集塊内の細胞接着が最も密になった。この時、表層にはじめて典型的な pinacocyte が出現する。電顕試料の光顕観察はカイメン細胞のように、小型で、顆粒を多くもったものには極めて有効で、細胞の種類の判別が容易であった。

文 献

- CURTIS, A. S. G., 1962, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 37: 82-129.
 GALTISOFF, P. S., 1925, J. Exptl. Zool., 42: 183-221.
 HUMPHREYS, T. 1963, Develop. Biol., 8: 27-47.
 木戸哲二・鬼武一夫, 1966, 金沢大学付属能登臨海実験所年報., 6: 9-15.
 木戸哲二・岸田嘉一, 1967, 同上., 7: 37-42.
 木戸哲二・岸田嘉一・朝倉弘修, 1964, 同上, 4: 121-127.
 木戸哲二・岸田嘉一・朝倉弘修・山田正明, 1965, 同上, 5: 3-8.
 KURODA, Y., 1963, Exptl. Cell Res., 30: 446-448.
 KURODA, Y., 1968, Ibid., 49: 626-637.
 MOOKERJEE, S. and B. Ganguly, 1964, Roux' Arch., 155: 525-534.
 MOSCONA, A., 1961a, Exptl. Cell Res., 22: 455-475.
 MOSCONA, A., 1961b, Nature, 190: 408-409.
 MOSCONA, A., 1962, J. Cellular Comp. Physiol., 60: Suppl. 1: 65-80.
 MOSCONA, A., 1963, Proc. Natl. Acad. Sci., 49: 742.
 SPIEGEL, M., 1954, Biol. Bull., 107: 130-148.
 STEINBERG, M. S., 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48: 1769.
 TOWNES, P. L. and J. Holtfreter, 1955, J. Exptl. Zool., 128: 53-120.
 WILSON, H. V. 1907 J. Exptl. Zool., 5: 245-258.
 WILSON, H. V. and J. T. Penney, 1930, J. Exptl. Zool., 58: 73-147.
 山元寅男, 1963, 解維, 38: 124-128.

Summary

There needs to obtain a constantly uniformed fabric of the reaggregates made of dissociated sponge cells for the elaboration of the properties of the various cells in the reaggregates. We, for the above purpose, adopted a new method that the dissociated cells were centrifuged in 500-800 rpm. in Ca- and Mg-free seawater, and then the wide-mouthed pipette (3mm in inside diameter) was put into the agglomerate accumulated in the bottom of the centrifuge tube. The cell mass sucked up in the pipette was pushed out in Petri-dish filled with Ca- and Mg-free seawater. The cylindrical cell mass thus formed was cut into 1 mm length. These uniformed cell masses were used as "centrifugal pellets" for the experiment. After these centrifugal pellets were reared in the normal seawater for various hours, they were fixed in cold 1 % osmium tetroxide solution in seawater, dehydrated in a series of acetone and embedded in Epon 812. These specimens were sectioned in 0.5-1 μ thickness with the ultramicrotome and stained with toluidine blue buffered with phosphate.

Several kinds of cells such as nucleolate cell, choanocyte, gray cell, rhabdiferous cell and pinacocyte were well observed in the centrifugal pellet. The characteristic of each cell was more clearly identified than with the prepares by paraffin sectioning.

The cell aggregation in "centrifugal pellet" transferred into normal seawater became more compact as the sequence of the time, and reached the maximum after three hours. Thereafter, the contact of cell to cell became rather loose at the inner part of the centrifugal pellet and subsequently disintegration of cells was there seen. Whereas, in the outermost layer of the centrifugal pellet, the close cell-contact remained even after nine hours.

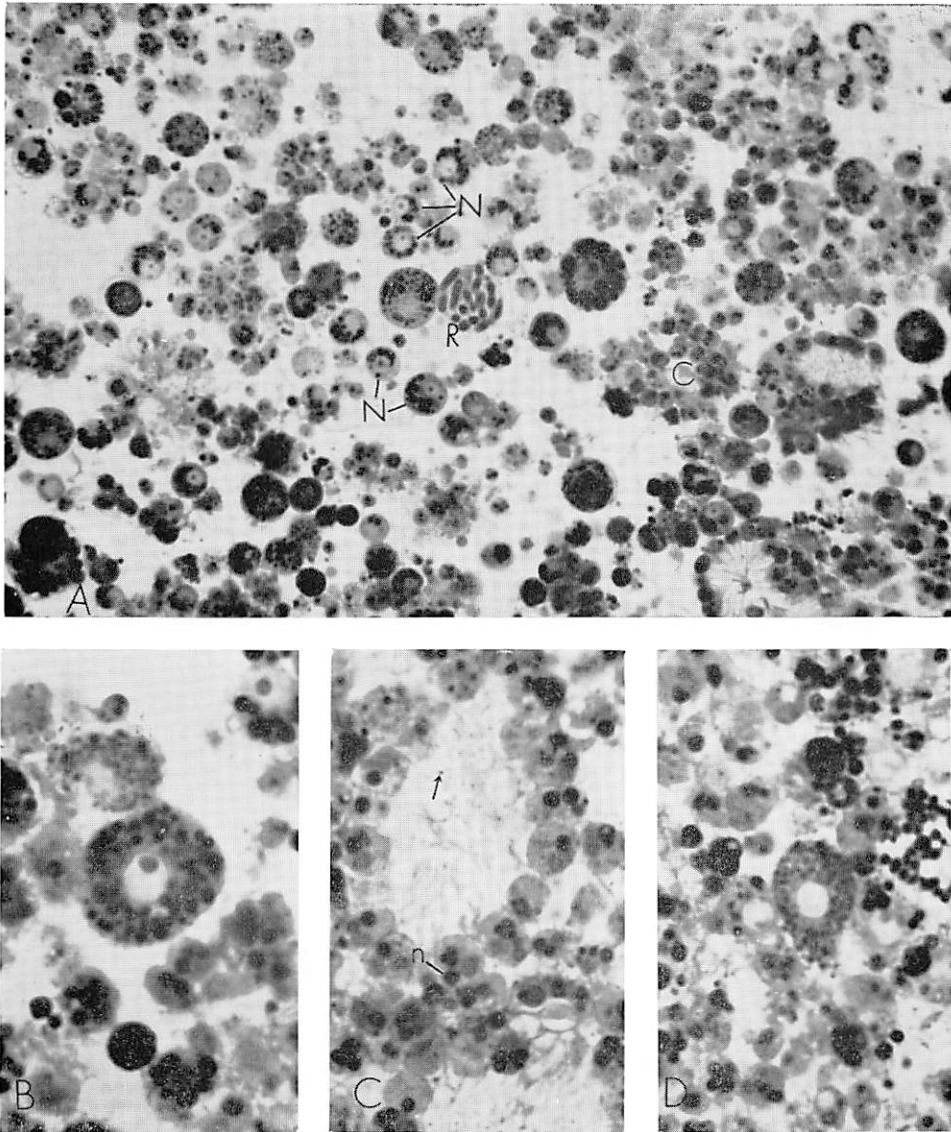


Fig. 1. A part of "centrifugal pellet" made of the dissociated sponge cells, being demonstrated by the half-thin section stained with buffered toluidine blue solution.

- A : Low-magnified photograph showing the various types of cells. Most cells are round and in free. Many nucleolate cells (N) and choanocytes (C) are disposed throughout the large area of the photograph. A rhabdiferous cell (R) is seen in the center.
- B : Nucleolate cell with a pale nucleus which contains a conspicuous nucleolus. The cytoplasm is filled with various sizes of granules stained deeply.
- C : Choanocyte establishing the flagellar chamber. One nucleus and two granules are observed in these cells. One of the granules is stained darkly as well as the nucleus (n) and an other is in pale. A black point (by arrow) encircled with collar (seen in circular line) shows a cross section of a flagellum of a choanocyte.
- D : Gray cell. Note that the cytoplasm is filled with many deeply stained small granule in homogeneous size.

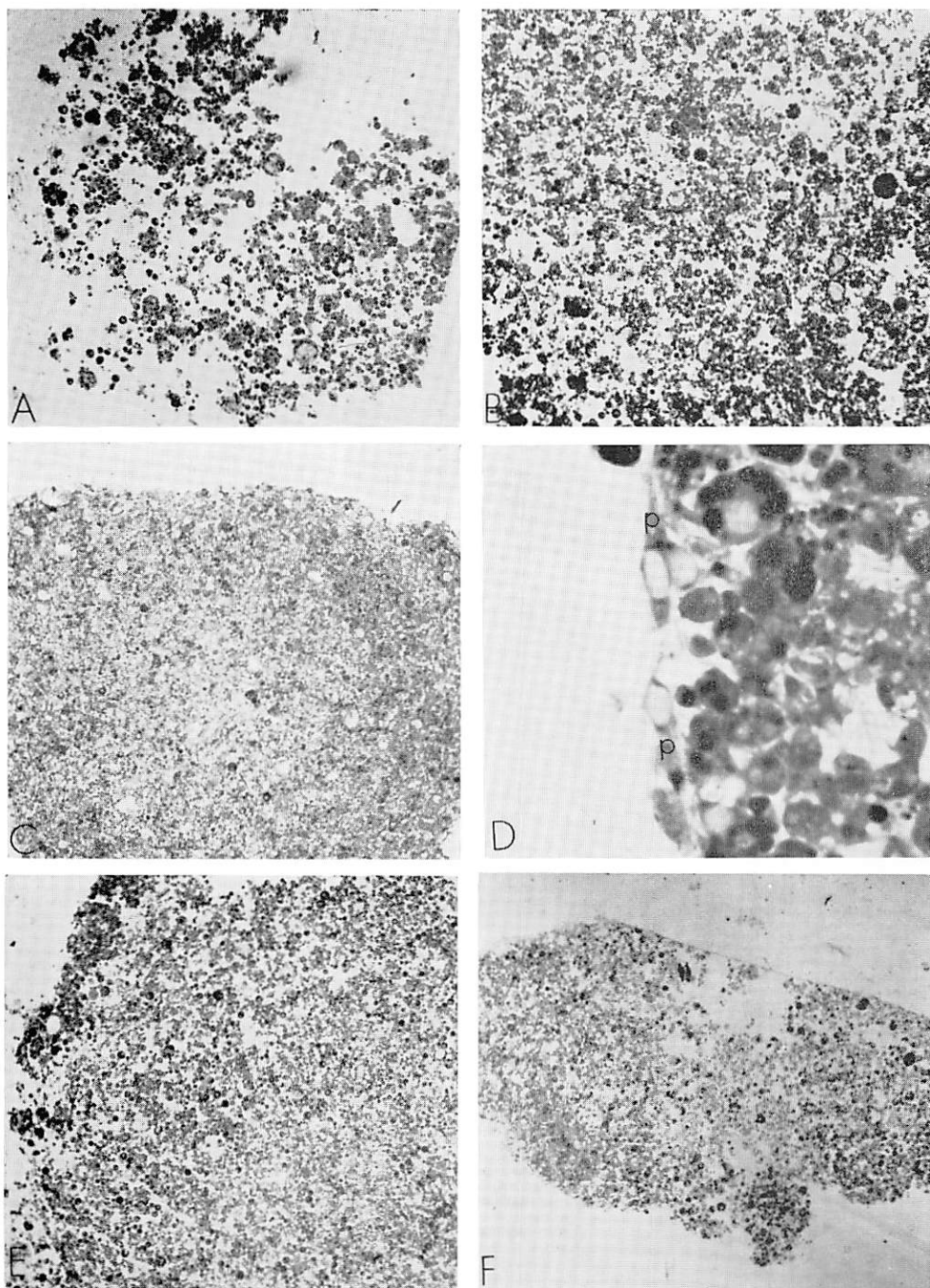


Fig. 2. Changes of the cell-disposal in the aggregates from the "centrifugal pellet" in various hours after they are transferred into normal seawater

A : 0 h-agg. B : 1 h-agg. C : 3h-agg, being very compact.

D : Pinachocytes (p) in the surface of 3 h-agg. E : 5 h-agg.

F : 7 h-agg. The cell-aggregation of the surface layer (below in the figure) is compact but that of the inner part (upper in the figure) is seen loose.